

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成28年4月23日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院理工学府  
職 名 准教授  
研究代表者 井上 裕介

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14008 )

1. 共同研究課題名	エピゲノム解析による HNF4 $\alpha$ を介した代謝制御機構の解明			
2. 共同研究目的	HNF4 $\alpha$ 欠損マウスの肝臓における DNA メチル化解析を行う。			
3. 共同研究期間	平成27年4月1日 ~ 平成28年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 井上 裕介	群馬大学大学院理工学府	准教授	研究総括、研究全般	
(分担研究者) 葉原 正靖	群馬大学大学院理工学府	准教授	人工核酸の合成	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	ゲノム科学リソース分野	氏 名	畑田出穂

## 6. 共同研究計画

肝臓の遺伝子発現制御ネットワークは、主に数種類の liver-enriched transcription factors によって複雑に制御されている、この中で最も重要な因子が核内受容体 Hepatocyte nuclear factor (HNF4 $\alpha$ )であり、HNF4 $\alpha$  は肝細胞の分化維持に必須であり、また脱分化した肝癌細胞を再分化させる能力を有する。我々は、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$ 欠損マウス(KO マウス)が血液凝固時間の延長や低鉄血症をはじめとする多くの代謝疾患を引き起こすこと、そしてその原因となる HNF4 $\alpha$ の標的遺伝子を数多く同定してきた。しかしながら、KO マウスにおける血糖値低下や NASH などの多くの表現型の発症機構は未解明であり、HNF4 $\alpha$ を起点とする転写制御カスケードの全容解明には至っていない。

KO マウスの血糖値低下はグルカゴン受容体(GCGR)の顕著な発現低下が原因であることまでは分かっている。昨年度のヒト肝癌細胞株を用いた解析により、GCGR の mRNA 発現は脱メチル化剤により誘導されることが分かったため、GCGR の発現はプロモーター領域の DNA メチル化により転写レベルで制御されていることが示唆される。しかしながら、HNF4 $\alpha$ が GCGR の発現を直接的制御しているのかについては未解明で、HNF4 $\alpha$ とプロモーターのメチル化との関連についても未解析である。また、KO マウスで発現増加する遺伝子の中には DNA メチル化酵素が含まれているため、GCGR の発現制御機構は非常に複雑であると推測される。以上より、本研究では GCGR 遺伝子の解析により、KO マウスにおける低血糖発症機構の解明を目的とし、以下の解析を行った。

### 1. HNF4 $\alpha$ 強制発現と脱メチル化剤による GCGR の発現解析

ヒトおよびマウスの肝癌細胞株において、HNF4 $\alpha$ 強制発現と脱メチル化剤を組み合わせることで GCGR の発現誘導効果を解析する。

### 2. GCGR のプロモーター解析

KO マウス肝臓で顕著に発現が減少するマウス GCGR 遺伝子のプロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼアッセイにより、最小プロモーター領域の同定と HNF4 $\alpha$ とメチル化依存的な転写誘導機構を解析する。

## 7. 共同研究の成果

GCGR 遺伝子の発現制御機構の解明のために以下の解析を行った。

### 1. HNF4 $\alpha$ 強制発現と脱メチル化剤による GCGR の発現解析

昨年度の共同研究により、肝癌由来細胞株を脱メチル化剤(5-aza-dC)で処理によりGCGRの発現が約2倍に増加することが明らかにした。このため、本年度はヒト肝癌細胞株(HepG2 および Huh7)とマウス肝癌細胞株(Hepa1-6)に HNF4 $\alpha$ を一過性に強制発現したところ、GCGR の発現が大きく上昇することが分かった。さらに、HNF4 $\alpha$ の強制発現時に 5-aza-dC で処理することにより、GCGR の発現がさらに上昇することも分かった。

次に、PiggyBac トランスポゼースを用いて HepG2 細胞において HNF4 $\alpha$ 発現安定株を作成した。その結果、HNF4 $\alpha$ の一過性発現と同様に GCGR の発現が大きく上昇することが分かった。以上より、GCGR は HNF4 $\alpha$ とDNAの脱メチル化により協同的に発現が誘導されること、GCGRの発現誘導にはHNF4 $\alpha$ の方が脱メチル化剤よりも効果的であることが明らかになった。

### 2. GCGR のプロモーター解析

上記の肝癌細胞株では内在性 GCGR の発現が低いため、高感度の NanoLuc を用いてマウス GCGR 遺伝子の遠位プロモーター(約 2kb)をクローニングした。ルシフェラーゼアッセイ結果、HNF4 $\alpha$ の導入により GCGR のプロモーター活性が上昇することが確認できた。しかしながら、その発現上昇は 2~3 倍程度であり、上記の mRNA の発現上昇と比較してプロモーター活性の誘導は弱いことが分かった。また、昨年までの研究により、この領域には KO マウスで高頻度にメチル化されている CpG アイランドが検出できなかった。このため、この遠位プロモーターは HNF4 $\alpha$ と脱メチル化剤による発現誘導には十分な領域でないと結論づけた。このため、次年度では、さらに長鎖に遠位プロモーター加え、近位プロモーターをクローニングし、HNF4 $\alpha$ により十分に発現誘導されるプロモーター領域の同定を目指す。さらには 5-aza-dC 処理によりプロモーター活性が上昇する領域を同定し、バイサルファイトシーケンスにより KO マウスでメチル化されている CpG アイランドを同定する。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

該当なし